

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 437–439

Bemerkungen zum Nachweis des Thiamin im Serum mittels der Thiochrommethode

Von K.-U. Blum und R. Merkel

Medizinische Klinik der Universität Freiburg/Brsg.

(Eingegangen am 27. Juni 1974)

Bei der Bestimmung des „Gesamt-Thiamingehaltes“ des Vollblutes mit Hilfe der Thiochrommethode zeigt sich eine hohe Eigenfluoreszenz des Vollblutes, die über 50% der gemessenen Gesamtfluoreszenz beträgt. Aus diesem Grunde sind auf solche Art gewonnene Werte nur sehr vorsichtig zu interpretieren.

Observations on the determination of thiamine in serum by the thiochrome method

In the determination of the "total thiamine" concentration of whole blood by the thiochrome method, it was found that the intrinsic fluorescence of the whole blood accounted for more than 50% of the measured total fluorescence. Great care is therefore necessary in the interpretation of results obtained in this way.

Zur Bestimmung der Konzentration von Thiamin und Cocarboxylase (Thiaminpyrophosphat, TPP) im Blut stehen im wesentlichen zwei Methoden zur Verfügung: Der mikrobiologische Nachweis und die sog. Thiochrommethode (1–3).

Der chemische Nachweis des Thiamins mit Hilfe der Thiochrommethode beruht im wesentlichen darauf, daß Thiamin unter Einwirkung von NaOH und $K_3[Fe(CN)_6]$ in Thiochrom überführt wird, dessen Konzentration fluorimetrisch gemessen werden kann. Hierbei wird zunächst der Gehalt an Thiamin selbst bestimmt. In einem zweiten Arbeitsgang wird die Cocarboxylase durch enzymatische Spaltung dephosphoryliert und anschließend der Gesamtgehalt an Thiamin bestimmt. Durch Subtraktion kann dann zusätzlich die Konzentration des TPP errechnet werden.

Mit dieser Methode wurde in verschiedenem Material der Gehalt an Thiamin und TPP bestimmt. Im wesentlichen handelte es sich hierbei jedoch um Nahrungsmittel und auch andere Substrate, die Thiamin bzw. TPP in verhältnismäßig größerer Konzentration enthalten (1, 3).

Für die Bestimmung des Thiamingehaltes des Blutes ist von *Haugen* eine Methode angegeben worden, mit der reproduzierbare Werte erhalten wurden (4–6). Diese Methode wurde geringfügig modifiziert in früheren Arbeiten, bei denen das Substrat jedoch keine Serumbeimengungen enthielt, von den Verff. mit gutem Erfolg angewandt (7).

Bei Übertragung dieser Methode auf menschliches Blut treten experimentelle Schwierigkeiten auf, die Veranlassung geben, hierüber zu berichten.

Methodik

Die Abweichungen gegenüber der Originalmethode von *Haugen* bestanden in folgenden Einzelheiten:

1. Enteiweißung von hämolysiertem Vollblut mit Perchlorsäure anstatt mit Trichloressigsäure
2. Spaltung des TPP mit Clarase¹⁾ anstatt mit gereinigter Phosphatase
3. Messung der Fluoreszenz im Photometer Eppendorf mit Fluoreszenzzusatz.

Im einzelnen wurde wie folgt vorgegangen:

Gesunden Versuchspersonen wurde durch Venenpunktion Blut entnommen und mit Liquemin ungerinnbar gemacht. 10,0 ml dieses Blutes wurden durch Tiefgefrieren hämolysiert. Anschließend Fällung in 20,0 ml Perchlorsäure (50 g/kg). Danach wurde 10 min mit dem Homogenisator nach *Potter-Elvehjem* bei Aufrechterhaltung der Temperatur von 0 °C homogenisiert.

Der Überstand wurde durch Zentrifugieren über 10 min in der Zentrifuge Christ-Junior II bei 5000 Umdrehungen/min und anschließendes Dekantieren gewonnen. Der gewonnene Überstand war ungetrübt und zeigte eine klare Wasserfarbe. Neutralisation des Überstandes mit 4,0 mol/l Kaliumacetatlösung (22 ml Überstand + 3 ml Neutralisationslösung). Anschließendes Stehenlassen für 10 min im Eisbad. Danach erfolgte Zentrifugieren unter den oben geschilderten Bedingungen für 10 min und Dekantieren.

Zur Bestimmung des Gesamtthiamingehaltes erfolgte anschließend die Abspaltung des Pyrophosphates durch 0,3 ml 10%ige Clarase-Lösung unter Lichtabschluß und Schütteln für eine Zeit von 30 min bei 45 °C. Der pH-Wert dieser Inkubationslösung betrug bei mehrfachen Kontrollen 5,0. Nach der Inkubation zeigten die Lösungen eine Trübung, die eine Filtration erforderlich machte. Die Filtration erfolgte unter Verwendung eines G 4-Filter. Von dem gewonnenen, klaren Filtrat wurden jeweils 5,0 ml zur Durchführung der Thiochromreaktion in Form von Doppelbestimmungen eingesetzt.

Der Thiochromtest wurde durchgeführt, indem in entsprechende Scheidetrichter 5,0 ml Natronlauge (400 g/l) und 0,2 ml einer

¹⁾ Clarase 900 (Fa. Marschall, Division Miles Laboratories Inc. Elkhart, Ind. U.S.A.).

Kaliumhexacyanoferrat-[III]-Lösung (20 g/l) eingegeben wurden und anschließend innerhalb von 30 bis 40 s 5,0 ml des klaren Filtrates zugegeben wurden. Einschließlich des anschließenden kräftigen Schüttelns erforderte dieser Vorgang insgesamt eine Zeit von 75 s. Stoppen der Oxidation durch Zugabe von 2 Tropfen 30 g/l H_2O_2 . Nach Zusatz von 10,0 ml fluoreszenzfreien Isobutanols wurde 30 s erneut kräftig geschüttelt. Durch diesen Vorgang geht das Thiochrom in die Isobutanolphase über. Nach Abtrennen der Isobutanolschicht und 2 min zentrifugieren konnten 5,0 ml der Isobutanolphase abpipettiert und in einem Reagenzglas mit 0,5 ml absolutem Alkohol versetzt werden. Nach gutem Durchschütteln erfolgte anschließend die Fluoreszenzbestimmung in einer Quarzküvette. Die Schichtdicke der Küvette betrug 10,0 mm.

Bei der Bestimmung der Fluoreszenz wurde mit einem Primärfilter von 313 bis 366 nm angeregt und die emittierte Strahlung unter Verwendung eines Sekundärfilters von 400 bis 3000 nm gemessen.

Wenn eine konstante Anzeige erreicht war (1–5 min), wurde der Wert bei den entsprechenden Verstärkungsstufen abgelesen.

Für den gesamten Untersuchungsgang wurde ein Reagenzienblindwert angesetzt, bei dem durch Zugabe eines Tropfens Benzolsulfonylchlorids das Thiamin blockiert wurde. Dieser Wert beinhaltet den Reagenzienblindwert und die vorhandene „Eigenfluoreszenz“ des Blutes, die auf andere, nicht die Thiochromreaktion gebende Verbindungen zu beziehen ist.

Da die Clarase eine gering positive Thiochromreaktion zeigte, wurde bei den Untersuchungen außerdem ein Blindwert der Clarase, bezogen auf Thiochrom, durch einen gleichlaufenden Analysengang ermittelt und bei den Analysen in Abzug gebracht.

Als Bezugsgröße lief bei jedem Versuchsansatz ein Vergleichswert von TPP in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/l}$ mit. Diese Konzentration entspricht etwa der, wie sie im Blut zu erwarten ist. Auf diese Art wurden folgende Meßgrößen gewonnen:

1. Hauptwert = Meßwert des eingesetzten Hämolyrates
2. Blindwert = Meßwert des mit Benzolsulfonylchlorid blockierten Hämolyrates

Wird der Blindwert vom jeweiligen Hauptwert subtrahiert, ergeben sich folgende Größen:

- A = Fluoreszenz Vollblut
B = Fluoreszenz TPP Vergleichslösung
C = Fluoreszenz Claraselösung.

Unter Verwendung dieser Daten kann dann die Gesamtthiaminkonzentration im Vollblut nach folgender Formel berechnet werden:

$$\frac{0,05 \cdot (A - C) \cdot 1000}{(B - C)} = \text{Gesamtthiamingehalt in } \mu\text{g/l Vollblut}$$

Ergebnisse und Diskussion

Aus Tabelle 1 gehen die gewonnenen Meßwerte bei fünf unabhängig voneinander durchgeführten Bestimmungen hervor. Die sechste Bestimmung erfolgte bei einem Patienten nach einer kurz vorher erfolgten parenteralen Thiaminzufuhr.

Wie zu ersehen ist, schwankt die Konzentration an Gesamtthiamin (Thiamin + TPP) zwischen Werten von 23 bis 59 $\mu\text{g/l}$. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß bei einem relativ konstanten Wert für Claraselösung der Blindwert im Vollblut bei relativ geringen Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchspersonen über 50 % des gemessenen Hauptwertes ausmacht. Mit anderen Worten, die Eigenfluoreszenz des Blutes weist einen höheren Wert auf als die Fluoreszenz, die auf den Anteil an Gesamtthiamin zurückzuführen ist. Der eindeutig erhöhte Wert nach parenteraler Thiaminzufuhr läßt sich besser nachweisen. Bei einer Doppelbestimmung (im Grunde handelt es sich hierbei dann um eine 4fache Bestimmung) ist die Schwankungsbreite außerordentlich gering und beträgt nicht einmal 10%.

Die erhaltenen Resultate weisen darauf hin, daß eine Bestimmung der Thiaminkonzentration im Blut, wenn sie sich auf das Gesamtthiamin (Thiamin + TPP) bezieht, aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz nur sehr beschränkt verwertbar ist. Die Werte dürften bei alleiniger Bestimmung des Thiamingehaltes, der natürlich noch wesentlich niedrigere Ausschläge ergeben wird, bei gleichbleibend hoher Eigenfluoreszenz noch ungünstiger liegen.

Bei Bestimmungen, die nicht im Vollblut, sondern im Serum durchgeführt werden, ist zu berücksichtigen, daß die Eigenfluoreszenz im Verhältnis zum Gesamtthiamingehalt noch höher sein wird, da die Hauptquelle der Störsubstanzen im Serum zu suchen ist.

So treten z. B. bei Untersuchungen an gewaschenen Erythrocytensuspensionen solche Störmechanismen

Tab. 1. Gesamtthiamin im Vollblut.

Probanden	Vollblut			TPP-Vergleichslösung			Clarase-Lösung			Thiaminkonzentration [$\mu\text{g/l}$]
	Hauptwert	Blindwert	A	Hauptwert	Blindwert	B	Hauptwert	Blindwert	C	
Fr. J.	70	49	21	65	37	28	47	36	11	29
Hr. St.	85	54	31	71	43	28	54	43	11	59
R. M.	60	39	21	56	20	36	32	22	10	42
Hr. H.	50	40	10	56	23	33	27	24	3	23
W. S.	99	69	30	84	41	43	50	36	14	28
Fr. H.	672	52	620	60	25	35	27	21	6	1060
	620	52	568							970

kaum auf, da durch das Waschen das Serum und die darin enthaltenen fluoreszierenden Bestandteile weitgehend entfernt worden sind. Bei solchen Versuchen gewonnene Werte sind sehr gut reproduzierbar und damit auch aussagekräftig (7).

Ein Unterschied zwischen dieser nur sehr beschränkt verwertbaren beschriebenen Methode und den Resultaten von *Haugen* (4, 5) mag darin liegen, daß *Haugen* für die Messung der Fluoreszenz ein geeigneteres Gerät benutzte (Fluorimeter der Fa. Farrand Optical, Inc.). Jedoch dürften auch hier die Eigenfluoreszenzen des Blutes relativ hoch liegen.

Aus diesem Grunde erscheint es nur unter gewissen Vorbehalten möglich, Werte direkt auf Thiochrom bzw. Thiamin zu beziehen, die mit der Thiochrommethode aus Vollblut gewonnen werden und nicht auf eine andere Art und Weise von der Eigenfluoreszenz befreit werden.

Eine Möglichkeit, die Eigenfluoreszenz des Blutes zu eliminieren, würde in der säulenchromatographischen Abtrennung, z. B. mit Hilfe von Aluminiumoxid bestehen, wie sie z. B. bei der Retinolbestimmung, bei der ähnliche Schwierigkeiten bestehen, eingesetzt wird (8). *L. Westermann* (9) verwendet zur Eliminierung der Fremdfluoreszenzen die Trennung an Sephadex G 25.

Literatur

1. Lamden, M. P. (1972), in *The Vitamins*, Vol. V, 15: Thiamine. IV Estimation in Foods (Sebrell jr., W. H. & Harris, R. S. ed.) Academic Press. New York und London.
2. Stepp, W., Kühnau, J. & Schröder, H. (1952), *Die Vitamine und ihre klinische Anwendung* Bd. I F. Enke Verlag, Stuttgart.
3. Strohecker, R. & Henning, H. M. (1963), *Vitaminbestimmungen* Verlag Chemie. Weinheim/Bergstr.
4. Haugen, H. N. (1961), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 13, 50–56.
5. Haugen, H. N. (1964), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 16, 260–266.
6. Haugen, H. N. (1965), *Thiaminundersøkelser*. Universitetsforlaget Oslo.
7. Blum, K.-U. & Thomas, L. (1970), *Pharmacol. Clin.* 2, 177–181.
8. Brubacher, G. & Vuilleumier, J. P.: persönliche Mitteilung.
9. Westermann, L. (1969), *diese Z.* 7, 509–513.

Prof. Dr. K.-U. Blum
Medizinische Klinik der Universität
7800 Freiburg i. Br.
Hugstetter Straße 55